

BEST AVAILABLE COPY

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

願 年 月 日
Date of Application:

2002年 5月 2日

願 番 号
Application Number:

PCT/JPO2/04405

願 人
Applicant(s):

独立行政法人科学技術振興機構

高井 俊行

阿相 皓晃

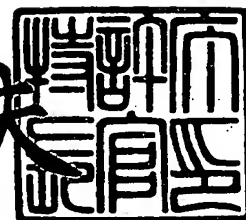
藤原 道弘

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2004年 6月17日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井 康夫



出証平 16-500151

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年05月02日（02.05.2002）木曜日 13時33分14秒

A031-35PCT

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	PCT/JPC2/04405
0-2	国際出願日	02.05.02
0-3	(受付印)	PCT International Application 日本国特許庁
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 0-4-1 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.01.2002)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	A031-35PCT
I	発明の名称	オリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	科学技術振興事業団
II-4en	Name	JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION
II-5ja	あて名:	332-0012 日本国 埼玉県 川口市 本町四丁目1番8号
II-5en	Address:	1-8, Honcho 4-chome Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	048-226-5619
II-9	ファクシミリ番号	048-226-5652

III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-1-4j a	氏名(姓名)	高井 俊行
III-1-4e n	Name (LAST, First)	TAKAI, Toshiyuki
III-1-5j a	あて名:	981-0872 日本国 宮城県 仙台市 青葉区星陵町4番1号 東北大学加齢医学研究所
III-1-5e n	Address:	c/o Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University 4-1, Seiryochō, Aoba-ku Sendai-shi, Miyagi 981-0872 Japan
III-1-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-1-7	住所(国名)	日本国 JP
III-2	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-2-4j a	氏名(姓名)	阿相 皓晃
III-2-4e n	Name (LAST, First)	ASO, Hiroaki
III-2-5j a	あて名:	173-0015 日本国 東京都 板橋区 栄町35番2号 東京都老人総合研究所
III-2-5e n	Address:	c/o Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology 35-2, Sakaecho Itabashi-ku, Tokyo 173-0015 Japan
III-2-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-2-7	住所(国名)	日本国 JP
III-3	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-3-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-3-4j a	氏名(姓名)	藤原 道弘
III-3-4e n	Name (LAST, First)	FUJIWARA, Michihiro
III-3-5j a	あて名:	814-0133 日本国 福岡県 福岡市 城南区七隈八丁目19番1号 福岡大学 薬学部
III-3-5e n	Address:	c/o Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University 19-1, Nanakuma 8-chome, Jonan-ku Fukuoka-shi, Fukuoka 814-0133 Japan
III-3-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-3-7	住所(国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年05月02日 (02.05.2002) 木曜日 13時33分14秒

A031-35PCT

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	廣田 雅紀
IV-1-1en	Name (LAST, First)	HIROTA, Masanori
IV-1-2ja	あて名:	107-0052 日本国 東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階
IV-1-2en	Address:	3F, Wakabayashi Building, 8-5, Akasaka 2-chome Minato-ku, Tokyo 107-0052 Japan
IV-1-3	電話番号	03-5575-6500
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-5575-6578
IV-1-5	電子メール	hirota-t@interlink.or.jp
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AU CA US
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	出願日	2001年05月16日 (16.05.2001)
VI-1-2	出願番号	特願2001-146338
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年05月02日 (02.05.2002) 木曜日 13時33分14秒

A031-35PCT

VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て（米国を指定国とする場合）	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	-	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書（申立てを含む）	5	-
IX-2	明細書（配列表を除く）	22	-
IX-3	請求の範囲	3	-
IX-4	要約	1	EZABST00.TXT
IX-5	図面	6	-
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数（明細書の配列表を除く）	37	
IX-6	明細書の配列表	2	-
IX-7	合計	39	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-9	個別の委任状の原本	✓	-
IX-11	包括委任状の写し	✓	-
IX-16	コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド又はアミノ酸配列表		
IX-16(i)	規則13の3に基づき提出する国際調査のための写し（国際出願の一部を構成しない）	-	1 フレキシブルディスク
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
IX-18	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
IX-18	その他	国際事務局の口座への振込を証明する書面	-
IX-18	その他	陳述書	-
IX-18	その他	FDの情報を記録した書面	-
IX-19	要約書とともに提示する図の番号	1	
IX-20	国際出願の使用言語名:	日本語	
X-1	提出者の記名押印		
X-1-1	氏名(姓名)	廣田 雅紀	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	02.05.02
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	

特許協力条約に基づく国際出願願書

A031-35PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2002年05月02日（02.05.2002）木曜日 13時33分14秒

10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

明 細 書

オリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物

5 技術分野

本発明は、D A P 1 2 (DNAX activation protein 12) 遺伝子機能が染色体上で欠損したオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物、及び該オリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物を用いた、オリゴデンドロサイトの発達促進若しくは発達抑制物質、又はミエリン形成促進若しくは抑制物質などのスクリーニング方法や、精神神経障害治療薬のスクリーニング方法や、精神神経障害の診断方法等に関する。

背景技術

D A P 1 2 (DNAX activation protein 12) は活性化モチーフ I T A Mを有する膜貫通タンパク質であり、リン酸化により Z A P - 7 0 や S y k と結合することが示唆されており、ヒトにおいて 1 9 q 1 3 . 1 に位置する 1 コピー遺伝子にコードされ、マウスにおいても存在することが知られている。かかる D A P 1 2 の m R N A は単球、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞などに多く発現され、D A P 1 2 は単に K A R 群の活性化シグナリングに関与するだけではなく、ヒト signal regulatory protein (S I R P) beta1、ヒトやマウスの myeloid DAP12-associating lectin (M D L) -1、triggering receptor expressed on myeloid cells (T R E M) と会合することも知られている。また、D A P 1 2 が C D 9 4 / N K G 2 C など、C タイプレクチンファミリーに属する K A R 分子とも会合し、機能していることが報告されている (Immunity 8, 693-701, 1998、J. Immunol. 161, 7-10, 1998、J. Immunol. 160, 4148-52, 1998)。

硬化性白質脳症を伴う多発嚢胞性脂肪膜性骨異形成症、又は那須－ハコラ病 (Suppl. 232, 1-173, 1972、Acta Pathol. Jpn. 23, 539-558, 1973、J. Med. Genet. 34, 753-757, 1997) は、日本とフィンランドにおいて発見された稀な中枢神経系疾患である。那須－ハコラ病患者は、骨嚢胞組織の形成に加えて、性格変化などの精神異常の症状を経て初老期痴呆を必発する。フィンランドの患者では、5.3 kb の D A P 1 2 [K A R A P (Killer activating receptor associated protein) / T Y R O B P (protein tyrosine kinase binding protein)] 遺伝子座が欠損する変異が見られた。別の欠陥をもつ日本の患者は、遺伝子の第3エクソンで単一のヌクレオチドが欠損しており、両患者とも、主に免疫組織にみられる細胞膜アダプター蛋白質 (membrane adaptor protein; J. Immunol. 158, 5083-5086, 1997、Nature 391, 703-707, 1998) である D A P 1 2 の機能が失われることによるものであることが知られている (Nature Genet. 25, 357-361, 2000)。しかしながら、精神異常の症状が D A P 1 2 の欠損によるものかどうかは知られていなかった。

他方、痴呆症モデル動物としては、従来、脳虚血を誘導するかアミロイドタンパクを蓄積させるなどの誘導方法しか開発されておらず、かかるモデル動物では痴呆に至るメカニズムを解析し、痴呆進行を予防するベースとしては利用価値が十分ではなかった。近年、D A P 1 2 欠損により那須－ハコラ病 (Nasu-Hakola) 病という若年性痴呆に至る精神神経症状が発症することは知られている (Nature Genet. 25, 357-361, 2000) が、根元的原因は未だ明らかになっておらず、また、D A P 1 2 欠損マウスにおいて、前頭葉および視床特異的にミエリン低形成が起こることや、精神分裂病の兆候を示すことは知られていなかった。

前記のように那須－ハコラ病は日本とフィンランドにおいて発見された稀な劣性遺伝病であるが、骨嚢胞形成と精神神経異常の症状を経て初

老期痴呆を必発する致死的な疾患である。本発明の課題は、那須－ハコ
ラ病、痴呆、精神分裂病、精神分裂病人格障害、強迫症状群、ハンチン
トン舞踏病、トゥーレット症候群等の精神神経障害に至るメカニズムを
解析し、精神神経障害の進行の予防方法や精神神経障害の治療方法を開
5 発することができる、D A P 1 2 (DNAX activation protein 12) 遺伝
子機能が染色体上で欠損したオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒ
ト動物、及び該オリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物を用い
た、オリゴデンドロサイトの発達促進若しくは発達抑制物質、又はミエ
リン形成促進若しくは抑制物質などのスクリーニング方法や、精神神経
10 障害治療薬のスクリーニング方法や、精神神経障害の診断方法等を提供
することにある。

本発明者らは、D A P 1 2 の生理的機能の解明について鋭意研究を進
め、D A P 1 2 遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわちD A
P 1 2 ノックアウトマウスを作製して脳所見を検討したところ、特に前
15 頭及び視床において、脱髄、すなわちミエリン形成不全症
(hypomyelinosi)を含む髄鞘形成傷害を示すことを見出し、また、
かかる障害がミエリンを形成する役割を担うオリゴデンドロサイトのD
A P 1 2 が欠損したためにこの細胞の分化・発達・脳内移動が阻害され
ることに起因することを見出した。さらに上記D A P 1 2 ノックアウ
20 トマウスの行動学的解析から、筋力などは正常であるにもかかわらず反
射能に障害がみられることを見出し、加齢に伴い精神分裂病に似た精
神異常症状を示すことを明らかにし、本発明を完成するに至った。

発明の開示

25 すなわち本発明は、D A P 1 2 (DNAX activation protein 12) 遺伝
子機能を染色体上で欠損させ、かつオリゴデンドロサイト発達障害を起

こさせることを特徴とするオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物（請求項 1）や、ミエリン形成発達障害を惹起させたことを特徴とする請求項 1 記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物（請求項 2）や、精神神経障害を発症させたことを特徴とする請求項 1

5 又は 2 記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物（請求項 3）や、精神神経障害が、那須－ハコラ病、痴呆、精神分裂病、精神分裂病人格障害、強迫症状群、ハンチントン舞踏病、又はトゥーレット症候群であることを特徴とする請求項 3 記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物（請求項 4）や、非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物（請求項 5）や、請求項 1 ～ 5 のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物に被検物質を投与すること、又は該動物由来の組織、器官、若しくは細胞を被検物質と接触させることを特徴とするオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法（請求項 6）や、請求項 1 ～ 5 のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物由来の組織、器官、又は細胞を被検物質と接触させ、該細胞におけるミエリン塩基性タンパク質の発現を測定・評価することを特徴とするオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法（請求項 7）や、請求

20 項 1 ～ 5 のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物由来の組織、器官、又は細胞におけるミエリン塩基性タンパク質の発現を測定・評価することを特徴とするオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法（請求項 8）や、請求項 1 ～ 5 のいずれか記載のオリゴデンドロ

25 サイト発達障害モデル非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物におけるミエリン形成の発達又は脱髄の程度を測定・評価することを特徴

とするオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法（請求項 9）や、請求項 1～5 のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物の聴覚性刺激及び／又は聴覚性プレパルス抑制を測定・評価することを特徴とするオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法（請求項 10）に関する。

また本発明は、DAP12 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物と野生型非ヒト動物の場合とを比較・評価することを特徴とする請求項 7～10 のいずれか記載のオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法（請求項 11）や、非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項 7～11 のいずれか記載のオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法（請求項 12）や、オリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質が、ミエリン形成促進又は抑制物質であることを特徴とする請求項 7～12 のいずれか記載のオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法（請求項 13）や、請求項 7～12 のいずれか記載のオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法により得られるオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質（請求項 14）や、請求項 13 のいずれか記載のオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法により得られるミエリン形成促進又は抑制物質（請求項 15）や、請求項 1～5 のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物を、精神神経障害に対する治療薬のスクリーニングに使用することを特徴とする精神神経障害治療薬のスクリーニング方法（請求項 16）や、請求項 16 記載の精神神経障害治療薬のスクリーニング方法により得られる精神神経障害治療薬（請求項 17）や、請求項 1～5 のいずれか記載のオリゴデンドロサ

イト発達障害モデル非ヒト動物の病徴を、精神神経障害の診断に利用することを特徴とする精神神経障害の診断方法（請求項１８）に関する。

図面の簡単な説明

5 第１図は、本発明のD A P 1 2 ノックアウトマウスと野生型マウスの遺伝子地図と、各マウスにおけるP C R 法及びサザンブロット法の結果を示す図である。

10 第２図は、本発明のD A P 1 2 ノックアウトマウスと野生型マウスにおける神経細胞、ニューロフィラメント及びアストロサイトの状態を示す図である。

第３図は、本発明のD A P 1 2 ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるミエリン塩基性タンパク質の減少及びC N S ミエリン形成不全についての結果を示す図である。

15 第４図は、本発明のD A P 1 2 ノックアウトマウスと野生型マウスにおけるインビトロ及びインビボにおけるオリゴデンドロサイトでのD A P 1 2 タンパク質の発現についての結果を示す図である。

第５図は、本発明のD A P 1 2 ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるD A P 1 2 発現とミエリン形成についての結果を示す図である。

20 第６図は、本発明のD A P 1 2 ノックアウトマウス及び野生型マウスにおける感覚運動のゲーティングについての結果を示す図である。

発明を実施するための最良の携帯

25 本発明のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物とは、D A P 1 2 （DNAX activation protein 12）遺伝子機能が染色体上で欠損することにより、オリゴデンドロサイトの発達を障害する非ヒト動物をいう。かかる非ヒト動物は加齢に伴い、ミエリン塩基性タンパク質の発現

を減少させ、中枢神経系のミエリン形成に発達障害を惹起させたり、那須－ハコラ病、痴呆、精神分裂病、精神分裂病人格障害、強迫症状群、ハンチントン舞踏病、トゥーレット症候群等の精神神経障害をきたしたりする。また、上記DAP12遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、DAP12をコードする非ヒト動物の内在性遺伝子の全部又は一部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、DAP12を発現する機能を失なった非ヒト動物をいう。また本発明における非ヒト動物としては、マウス、ラット等の齧歯目動物を具体的に挙げる事ができるが、これらに限定されるものではない。

10 本発明における野生型の非ヒト動物とは、上記DAP12遺伝子機能が欠損した非ヒト動物と同種の動物を意味し、中でも同腹の動物を好適に例示することができる。メンデルの法則に従い出生してくる、これらのホモ接合体非ヒト動物におけるDAP12欠損型とその同腹の野生型は個体レベルで正確な比較実験を行うことができる点で同時に用いることが好ましい。そして本発明のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物の好適例としては、DAP12ノックアウトマウスを、野生型非ヒト動物としては該ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスを、それぞれ具体的に挙げる事ができる。以下、非ヒト動物がマウスの場合を例にとって説明する。

20 DAP12遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわちDAP12ノックアウトマウス(DAP12^{-/-})を作製する。DAP12ノックアウトマウスは、文献(Cell 76, 519-529, 1994)に記載する方法等によって作製することができる。具体的には、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、DAP12遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされたDAP12遺伝子を組換えDNA技術により、DAP12遺伝子の全部又は一部を、例え

ばネオマイシン耐性遺伝子等のマーカー遺伝子で置換し、5'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入してターゲティングベクターを作製し、この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション(電気穿孔)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロピア(GANC)等の抗生物質に抵抗性を示すES細胞を選択する。この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。

10 上記組換えES細胞をマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスと交配させると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスを交配させることによって、DAP12ノックアウトマウスを得ることができる。そして、
15 かかるDAP12ノックアウトマウスにおけるDAP12遺伝子が染色体上で欠損していることを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスの尾からDNAを単離してサザンブロット法等により調べる方法や、このマウスの骨髓マスト細胞等から抽出したタンパク質をイムノブロット分析等により調べる方法等を挙げることができる。

20 本発明のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物は、オリゴデンドロサイトの発達障害をきたすモデルや、中枢神経系のミエリン形成に発達障害をきたすモデルや、ミエリン形成過程を研究するモデルや、オリゴデンドロサイト発達障害に起因する病気の発症過程、ミエリン形成異常により生ずる痴呆症等の精神神経障害の発症過程などを研究する
25 モデル等に有用であり、かかるミエリン形成発達障害モデル非ヒト動物を用いると、オリゴデンドロサイト発達障害に起因する病気、例えば、

那須－ハコラ病、痴呆、精神分裂病、精神分裂病人格障害、強迫症状群、ハンチントン舞踏病、トゥーレット症候群等の精神神経障害に対する治療に有用な薬剤、すなわちオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質、ミエリン形成促進又は抑制物質などをスクリーニングすることができる。

本発明における、オリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質、ミエリン形成促進又は抑制物質などのスクリーニング方法としては、本発明のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物に被検物質を投与する方法や、オリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物由来の組織、器官、若しくは細胞を被検物質と接触させる方法を挙げることができる。オリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物由来の組織、器官、若しくは細胞を被検物質と接触させる方法としては、オリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物、例えば、前記DAP12ノックアウトマウス由来の組織、器官、又は細胞を被検物質と接触させ、該細胞におけるミエリン塩基性タンパク質の発現を測定・評価する方法を具体的に例示することができ、また、オリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物に被検物質を投与する方法としては、例えば、前記DAP12ノックアウトマウスに被検物質を投与し、該非ヒト動物由来の組織、器官、又は細胞におけるミエリン塩基性タンパク質の発現を測定・評価する方法や、前記DAP12ノックアウトマウスに被検物質を投与し、該非ヒト動物におけるミエリン形成の発達又は脱髄の程度を測定・評価する方法や、前記DAP12ノックアウトマウスに被検物質を投与し、該非ヒト動物の聴覚性刺激及び／又は聴覚性プレパルス抑制を測定・評価する方法などを具体的に挙げることができるが、これらに制限されるものではない。なお、上記スクリーニングに際して、DAP12ノックアウトマウスと同腹の野生型マウスと比較評価することが好ましい。

本発明のオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質、ミエリン形成促進又は抑制物質などのスクリーニング方法により得られる、オリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質の候補物質としては、

5 チロシン脱リン酸化酵素阻害物質、チロシンリン酸化酵素活性化物質などの各種低分子化合物等を挙げることができる。また、本発明の那須ーハコラ病、痴呆、精神分裂病、精神分裂病人格障害、強迫症状群、ハンチントン舞踏病、トゥーレット症候群等の精神神経障害に対する治療薬としては、上記のオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質、

10 ミエリン形成促進又は抑制物質などのスクリーニング方法により得ることができる、オリゴデンドロサイト発達促進物質若しくはミエリン形成促進物質、又はミエリン形成促進若しくは抑制物質などを有効成分とする治療薬であれば特に制限されるものではなく、かかる治療薬を哺乳動物等に適宜量及び方法で投与することにより、上記精神神経障害を治療することができる。

15 以下に、実施例を掲げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

参考例（DAP12ノックアウトマウスの作製）

DAP12ノックアウトマウスは、文献（Cell 76, 519-529, 1994）記載の方法により、129/SvJ（H-2^b）とC57BL/6（B6、

20 H-2^b）とのハイブリッドにより作製した。129/SvJマウス遺伝子ライブラリー（ストラタジーン社製）からDAP12ゲノムDNAを単離し、プロモーター領域及びDAP12遺伝子のエクソン1～3を含む5.1 kbのBam HI断片を、neo^rカセット（ストラタジーン社製）に置換し、負の選択マーカーとして単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ（HSV-TK）を挿入することにより構築した（図1a）。

25 なお、neo^rカセットは、5.1及び1.2 kbの相同配列をフラン

キング配列として有していた。このベクターを線状化し、エレクトロポレーションすることによってES細胞(RW4)に導入し相同的組換えを行った結果、7.1%の頻度でES細胞の相同組換え体を得ることができた。

- 5 上記の相同的組換え体からESクローンを単離し、G418及びGAN C (ガンシクロピア) に対してネオマイシン耐性ESクローンをスクリーニングし、サザンブロット法によって相同的組換え体を確認した。かかる相同的組換え体からゲノムDNAを単離して、Kpn I でダイジェストし、neo^rカセットを含むターゲッティングアレルを含んでいる
- 10 ことを確認した。かかる確認されたESクローンを胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製し、作製されたマウスを野生型のC57BL/6マウス(Charles River 社製)とインタークロスさせ、コントロールされた環境下で特異的病原体を遮断した施設において飼育することによってヘテロ接合体マウスを得た。また、ホモ接合体マウスを得るために、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせて、
- 15 DAP12遺伝子が染色体上で欠損した欠損マウス及びその野生型マウスを作製した。このようにして作製された本発明のDAP12ノックアウトマウスは少なくとも10ヶ月齢までは、文献(Immunity 13, 345-353, 2000、Immunity 13, 355-364, 2000)記載のように特段の異常を示すことなく、健康に成長した。この得られたDAP12ノックアウトマウスにおいてDAP12発現能が欠失しているかどうかの確認は、DAP12^{+/+}、DAP12^{+/-}、DAP12^{-/-}等のマウスの尾から得たゲノムDNAをKpn I で消化し、図1aに示されている領域のプロンプを用いたサザンブロット法により調べた(図1b)。
- 20
- 25 また、文献(Cell 76, 519-529, 1994)記載の方法によりDAP12^{+/-}及びDAP12^{-/-}マウスから骨髓マスト細胞(BMMC)を調製し、

かかるマスト細胞（各レーン2. 5×10^5 細胞相当）から抽出したタンパク質と、文献（Cell 70, 351, 1992）記載の方法により調製した抗ウサギDAP12抗血清（1:500で希釈）とを用いたイムノブロット分析においても調べてみた（図1c）。その結果、DAP12^{-/-}マウス由来の細胞においてDAP12タンパク質が検出されなかった。

上記DAP12と同種の細胞表面適応蛋白質（adaptor protein）であるDAP10の遺伝子が、たった0.1 kb離れたDAP12遺伝子に対して逆転写方向に同様の染色体DNA鎖に位置しているのが報告されている（J. Immunol. 163, 4651-4654, 1999、Science 285, 730-732, 1999）。そこで、上記DAP12ノックアウトマウスがDAP10遺伝子に影響を与えていないかどうかを調べるためにRT-PCR法を行った。上記DAP12^{+/+}又はDAP12^{-/-}マウス由来の骨髓マスト細胞（BMMC）から抽出した全RNA 3 μ gと、逆転写酵素 ReverTra Ace（TOYOBO 社製）を用いて各cDNAを合成し、以下のプライマーを用いてPCR法により増幅させ、DAP10のシグナルを確認した。その結果、DAP12^{-/-}マウスにおいてはDAP10の発現は正常だったが、DAP12 mRNAの発現はみられなかった。上記DAP12に特異的なプライマーとしては、5'-atgggggctctggagccct-3'（配列番号1；P1）及び5'-tcattctgtaatttgctct-3'（配列番号2；P2）を、DAP10に特異的なプライマーとしては、5'-atggacccccaggcta-3'（配列番号3；P3）及び5'-tcagcctctgccaggca-3'（配列番号4；P4）を用いた。

実施例1（DAP12ノックアウトマウスにおける神経細胞、ニューロフィラメント及びアストロサイトの状態）

生後3ヶ月齢のDAP12ノックアウトマウス（-/-）又は野生型マウス（+/+）を麻酔した後、酸-アルコール溶液（95%エタノー

ル／酢酸 5 % ; v o l %) で灌流し、かかるマウスから脳を単離した後、
酸-アルコール溶液で 1 晩固定し、固定した脳を標準プロトコルにより
パラフィン処理 (1 0 0 % エタノール、メチルベンゾアート、キシレン、
キシレンパラフィン、又はパラフィン溶液で各 1 ~ 2 時間ずつ処理する

5 操作) を施しパラフィン包埋した。包埋した脳をマイクロトームで 1 0 μ
m の厚さにスライスし、標準プロトコルによりデパラフィン処理 (キシ
レン、1 0 0 % エタノール、9 0 % エタノール、7 0 % エタノール、P
B S) を施した。細胞内ペルオキシダーゼ活性を 3 % の H_2O_2 で 1 0 分
間抑制した後、再度 P B S ですすぎ、切片を 0 . 5 % のスキムミルク

10 (D I F C O 社製) を含む、1 次抗体を含んだ P B S 中で 3 7 $^{\circ}C$ にて 1 時間
処理した。その後、P B S で 3 7 $^{\circ}C$ にて 3 分間、3 回振盪して洗い、1
0 0 倍希釈の H R P 標識抗ウサギ I g G 抗体 (M B L 社製) を含んだ 0 .
5 % のスキムミルク含有 P B S 中で 3 7 $^{\circ}C$ にて 5 0 分間 2 次抗体を作用
させた。

15 上記 2 次抗体により処理した切片を P B S 中で 3 7 $^{\circ}C$ にて 3 分間、3
回振盪して洗った後、文献 (Neurosci. Res. 37, 21-31, 2000) 記載の方
法と同様に D A B (ディアミノベンチジン ; 和光純薬工業社製) を用い
て免疫染色を行い視覚化した。また、1 次抗体の変わりにメチルグリー
ンを用いて、上記脳切片をニッスル染色し対比した (図 2 a ; N i s s
20 1) 。それらの結果を図 2 に示す。なお、図中のスケールバーは 2 5 0 μ
m を意味する。これらの結果から、D A P 1 2 ノックアウトマウス (-
/-) と野生型マウス (+ / +) における神経細胞 (図 2 a ; N i s s
1) 、ニューロフィラメント (図 2 b ; N F) 及びアストロサイト (図 2
c ; G F A P) では明らかな変化がみられなかった。

25 実施例 2 (ミエリン塩基性タンパク質の減少及び D A P 1 2 $^{-/-}$ マウス
における C N S ミエリン形成不全)

1 次抗体としてウサギ抗マウスMBP抗体（ニチレイ社製）を用いて、
実施例1と同様の方法により、図3b上部記載の脳の概略側面図におけ
る破線a（図3a）又は実線部分の冠状脳切片（図3b下図）を染色し
視覚化した。その結果を図3a及びbに示す。なお、図3a中のccは
5 脳梁を、ecは外包を、icは内包を、fimはフィンプリアを、th
lmは視床をそれぞれ意味し、スケールバーは250 μ mを意味する。
また、図3bの上部図はマウスの概略側面図を示し、影部分は大腦を意
味する。図3b中のcpは尾状核を、スケールバーは250 μ mを意味
する。これらの結果から、3ヶ月齢のDAP12ノックアウトマウスに
10 おいて、ミエリンの主要かつ特異的な構成要素であるミエリン塩基性タ
ンパク（MBP）の染色が脳の一部で減少していること、特に視床にお
いて特異的な減少が強調されていた（図中の大きな矢頭）。

上記視床においてみられたMBP染色の減少は、3ヶ月齢及び1.5
ヶ月齢のDAP12ノックアウトマウスの後部領域よりも、尾状核を含
む大腦前頭葉の方がより顕著であった。イムノブロット分析により、7
15 ヶ月齢のDAP12ノックアウトマウス6匹の脳全体から調製したミエ
リン画片におけるMBPシグナルの平均強度は、野生型マウスの強度の
74%であることがわかった。この結果から、中枢神経系（CNS）の
ミエリンにおけるMBP量が、成育した野生型マウスよりDAP12ノ
20 ックアウトマウスの方が減少していること、特に神経細胞、ニューロフ
ィラメント及びアストロサイトの欠損は伴わずに、大腦前頭葉及び視床
において減少していることを強く示唆していた。ミエリンは軸索を取
囲む多重層のラメラ膜構造であり、神経インパルスの伝達速度を増し、軸
索にとって重要な絶縁体として機能することが良く知られている
25 （Science 280, 1610-1613, 1998）。CNSではミエリンはオリゴデンド
ロサイトにより合成され、生まれてすぐミエリン鞘形成が起こる。また、

ヒトNHD患者における多くの剖検では前頭で強調されるミエリンの欠損及び視床の衰退が示されている (Acta Psychiatr. Scand. Suppl. 232, 1-173, 1972、Neuropathol. Appl. Neurobiol. 26, 98-101, 2000)。

MBP欠損マウス (shivererとして知られる) は、CNS軸索において、全身の震えとともにてんかん発作を伴う深刻なミエリン形成不全をもたらし、3ヶ月以内という早い時期に死亡に至ることが知られている (Neurosci. Lett. 12, 113-118, 1979)。成育したDAP12ノックアウトマウス (-/-) でみられたMBPの減少 (図3a、b) は、かかる動物において、不完全なミエリン形成によるミエリン形成不全、又は通常の代謝回転機構や炎症などの他の理由による脱髄が原因だと考えられる。そこで次に3ヶ月齢のDAP12ノックアウト (-/-) マウスから大脳前頭葉の尾状核を採取し、1%の O_2O_4 を含む0.1Mのカコジル酸ナトリウム中で処理した後、エボン812で包埋し、極薄 (85 nm) の大脳切片をHitachi H-7100システムで分析してみた。その結果、ミエリン形成不全が明らかに生じていることが確認できた (図3c)。また、各ミエリン鞘の周期線 (major dense line) を数えると、-/-マウスの多重層ミエリンラメラにおいて周期線が非常に減少していることがわかった (-/-マウス及び+/+マウスにおける平均 \pm s.d. はそれぞれ 6.98 ± 3.16 、 8.64 ± 3.31 であった。 $n = 128$ 、「**」は $P = 0.0001$ を意味する)。一方、周期線に特にゆるみなど見られないことから (図3b上部記載の脳の概略側面図における破線b部分の冠状脳切片)、ラメラ構造はぎっしり詰まった層を形成しているのが確認でき (図3dの矢頭)、ランビエ絞輪周囲領域では-/-マウスにおける脱髄の徴候はみられなかった (図3eの矢頭)。なお、図3eは40,000倍で観測したものであり、図3d及びe中のスケールバーは250 nmを意味する。

実施例 3 (インビトロ及びインビボにおけるオリゴデンドロサイトでの
D A P 1 2 タンパク質の発現)

脱髄とD A P 1 2 欠損との関係について、P a l o n e v a らはノー
ザンブロット及びR T - P C R 分析により、マウス由来のミクログリア
5 細胞、アストロサイト及び神経細胞の初期培養におけるD A P 1 2 のm
R N A の発現を明らかにしている (Nature Genet. 25, 357-361, 2000)。
しかし、D A P 1 2 タンパク質が実際に上記細胞、及びC N S における
マクログリア細胞として分類されるオリゴデンドロサイトで発現するか
どうかは明らかにされていない。そこで野生型マウス及びD A P 1 2 ノ
10 ックアウトマウス由来の、初期培養によるオリゴデンドロサイトをイム
ノブロット法で分析した。なお、上記オリゴデンドロサイトの培養は以
下に記載の方法で行った。

マウス由来のオリゴデンドログリアの培養は文献 (Cell 76, 519-529,
1994) 記載の方法により行った。生まれたばかりの野生型マウス (+/
15 +) とD A P 1 2 欠損マウス (-/-) の脳を細断し、分離培養法 (J. Cell
Biol. 85, 890-902, 1980) によりオリゴデンドログリアを調製した。一
つの脳に対して、10%のウシ胎児血清 (F B S) を含む約10mlの
ダルベッコ改変培地 (D M E M) に細胞を播き、文献 (Dev. Biol. 83,
311-327, 1981) 記載の方法と同様にアストログリア単層に付着したオリ
20 ゴデンドロサイトを orbital shaking により分離し精製した。精製した
細胞のうち95%以上の細胞がオリゴデンドロサイト特異的マーカーで
あるO 4 に対して陽性を示した。また、残りのアストロサイト細胞層を
トリプシン/E D T A を用いて分離・精製した。このアストロサイト画
分は、フローサイトメトリーにより、約2.0%がO 4 +オリゴデンドロ
25 サイトを含むことが確認できた。

上記精製された野生型又はD A P 1 2 欠損マウスからオリゴデンドロ

サイト (Oligo) 及びアストロサイト (Astro) をそれぞれ調製し、かかる細胞 (1 レーンあたり 1×10^5 細胞) から抽出したタンパク質を用いて実施例 1 と同様の方法によりイムノブロット分析を行った。なお、ポジティブコントロールとして参考例 1 で調製した骨髄マスト細胞 (BM MC ; 5×10^5 細胞) を用いた。その結果を図 4 a に示す。図中の矢印は D A P 1 2 の位置を示す。このことから、野生型マウス由来のオリゴデンドロサイトにおける D A P 1 2 のシグナル強度は、濃度計測によって同数のマスト細胞にほぼ匹敵しているのが確認でき、また、参考例記載の方法と同様に R T - P C R 分析を行ったところ、オリゴデンドロ
5 サイト細胞の m R N A から D A P 1 2 のシグナルが検出された。
10

前記精製した野生型マウス由来のオリゴデンドロサイトをマグネティックセルソーター (Miltenyi 社製) 及び抗 O 4 モノクローナル抗体を用いてさらに精製し、得られた O 4 ⁺ 細胞の細胞膜に小さな穴をあけ、その後精製したウサギ抗 D A P 1 2 I g G 抗体 (抗 D A P 1 2 抗体) 又はコントロールとしてのウサギ I g G (コントロール) と、F I T C 標識抗ウサギ I g G 抗体とを用いて染色し、フローサイトメトリーにより分析した結果、O 4 抗原に陽性を示すオリゴデンドロサイトで D A P 1 2 が発現しているのが確認できた (図 4 b)。
15

また、3 ヶ月齢の野生型マウス (+ / +)、10 日齢 (乳児期) の野生型マウス (+ / +)、又は 10 日齢 (乳児期) の D A P 1 2 ノックアウトマウス (- / -) 由来の脳における D A P 1 2 及び M B P に対する二重染色プロファイルを調べてみた。上記各マウスから実施例 1 と同様の方法により、脳切片 (図 3 b 上部記載の脳の概略側面図における破線 a 部分の冠状脳切片) を作製し、1 次抗体として抗 D A P 1 2 抗体を用いて 4 ℃ で 1 晩反応させ、2 次抗体として H R P 標識抗ウサギ I g G 抗体
20 を作用させた後 D A B で免疫染色した。染色後、脳切片を P B S で洗浄
25

し、0.1 Mのグリシン-HCl緩衝液（pH 2.2）中で1時間攪拌することにより抗体を取り除き、続いて、1次抗体としてウサギ抗マウスMBP抗体を用い37℃で1時間反応させ、2次抗体としてHRP標識抗ウサギIgG抗体を作用させた後4-クロロ-1-ナフトール（和光純薬工業社製）で青色に染色した。その結果を図4c～eに示す。なお、図4c中の矢頭はDAP12及びMBPで二重染色された細胞を示し、図4c～e中の各スケールバーは25 μmを意味する。

上記のことから、成育した3ヶ月齢の野生型マウスでは、脳梁（図4c）、フィンプリア、外包及び内包、視床（図5c）等において、DAP12とMBPとの両方のタンパク質に対し強く陽性を示すことから、これらタンパク質が共発現していることがわかる。かかる領域においてMBP及びDAP12を発現する細胞を同定し（図4c）、成育したマウスのCNSにおけるオリゴデンドロサイトのDAP12発現がほとんどのMBP発現を伴うことがわかった。これに対して、10日齢のDAP12ノックアウトマウス由来の脳梁ではMBP染色における減少（図2d）も、10日齢の野生型マウスのCNSにおけるDAP12の共発現（図2e）も検出することができなかった。これらのことから、DAP12欠損状態では、発育中の脳における早期のミエリン鞘形成は正常であり、DAP12発現は発育段階に応じて制御を受けていることが示唆され、DAP12ノックアウトマウスではミエリン低形成は発育後期の、遅くとも1.5ヶ月までに起こると考えられる。

実施例4（DAP12発現とミエリン形成とのカップリング）

3ヶ月齢のDAP12ノックアウトマウス（-/-）（図5a）又は野生型マウス（+/+）（図5b及びc）から内包（ic）及び視床（thlm）領域を含む脳切片を作製し（図3b上部記載の脳の概略側面図における破線a部分の冠状脳切片）、MBPの発現（図5a及びb）、又は



MBP及びDAP12の発現（図5c）を調べてみた。なお、MBPの発現は実施例2と同様の方法で、MBP及びDAP12の発現は実施例3と同様の方法により調べた。その結果を図5に示す。なお、図中の矢頭は脳の内包を、*印はDAP12陽性領域をそれぞれ示し、スケールバーはそれぞれ100 μ mを意味する。これらの結果から、3ヶ月齢（図5a）及び1.5ヶ月齢のDAP12ノックアウトマウス（-/-）において、多くのMBP陽性オリゴデンドロサイトが脳の内包（図5a中の矢印）、フィンプリア及び視床などの幾つかの領域で確認できた。一方、成育した野生型マウス（+/+）の脳におけるオリゴデンドロサイト細胞は、非常に多くのMBP陽性樹状突起が発達しているため、低倍率ではMBP染色により同定することがほとんどできなかった（図5b）。しかし、野生型マウスにおけるDAP12の染色強度は内包領域において最も顕著であった（図5c中の矢頭）。かかる領域は、DAP12ノックアウトマウスではオリゴデンドロサイト細胞群が位置していた（図5a）。これに対して、野生型マウス（図5c中の*印）においてDAP12が強く発現する領域は、DAP12ノックアウトマウス（図5a*印）ではMBPの発現が弱いことが確認できた。これらのことは、オリゴデンドロサイトによるミエリン鞘形成がDAP12の発現と密接に関係しているということを強く示唆している。DAP12ノックアウトマウスでは、野生型マウスにおいてミエリン鞘形成を進行させるオリゴデンドロサイトが、活性化されていなかった。以上のことから、CNSにおけるDAP12は、後発育期段階及び維持期段階におけるミエリン鞘形成の活性化において重要な役割を果たしていると考えられる。

実施例5（DAP12ノックアウトマウスにおける感覚運動のゲーティングの欠損）

視床は脳の中で最も重要な領域の1つで、全ての感覚器官からの刺激

を取り込み、神経伝達の調節により次の反応を決定している。それゆえ、D A P 1 2 ノックアウトマウスの視床における特異的なミエリン形成不全は、行動上の欠陥を引き起こすが、本実験で用いたD A P 1 2 ノックアウトマウスの行動は正常であった。興味深いことに、以前の文献

- 5 (Rinsho Shinkeigaku 32, 444-446, 1992) で、N H D 患者のM R I により、視床及び被殻において信号の強度が減少することが報告されている。そこで、5ヶ月齢のD A P 1 2 ノックアウトマウスにおける聴覚性驚愕反応及びプレパルス抑制を調べてみた。なお、聴覚性驚愕反応（左図）及びプレパルス抑制（右図）の概略図を図6 a に示す。マウスの聴
- 10 覚性驚愕反応はS R - L A B システム（San Diego Instruments 社製）によって測定し、チャンバー内のバックグラウンドのノイズレベルは65 d B で行った。最初の反射刺激を与える10分前に野生型マウス（+ / +）又はD A P 1 2 ノックアウトマウス（+ / +）をシリンダーに入れ、バックグラウンドのノイズで順応させた。驚愕反応の振幅を驚愕刺激開
- 15 始から100 m s e c 間だけ記録し、驚愕反応の最大振幅を計測した。聴覚性驚愕反応の測定における実験では、8種類の異なる驚愕刺激（70、75、80、85、90、100、110、又は120 d B ; 20 m s e c 間の刺激）を与え、同じ順序で各刺激を5回繰り返した。なお、実験は平均40秒の間隔をおいて行なった。その結果を図6 b に示す。
- 20 なお、図6 b 中の測定値は平均 \pm s . e . m . （ $n = 10$ 、「*」は $P < 0.05$ を意味する）で表した。図6 b に示すように、D A P 1 2 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べ、全体的に有意に低レベルの驚愕反応を示した [$F(1, 18) = 5.790$, $P < 0.05$]。また、この差は主として100及び110 d B における驚愕反応の低下によりも
- 25 たらされることが分かった。このことから、5ヶ月齢のD A P 1 2 ノックアウトマウスが聴覚性刺激に対して異常な反応を示すことがわかった。

聴覚性プレパルス抑制の測定における実験では、各セッションは7種類の異なった刺激から構成されており、無刺激、驚愕刺激のトライアルのみ、又はプレパルスを驚愕刺激に先行させたが、どの刺激においてもマウスの反応はみられなかった。2種類の驚愕としては、100又は120 dBで20 msec間驚愕刺激した。なお、驚愕刺激の開始前に、4種類の異なる聴覚性プレパルスと聴覚性驚愕刺激との組み合わせを100 msecで行った。各20 msecのプレパルス刺激（70又は80 dB）は、両方の聴覚性驚愕刺激の前に与えた。7種類の異なる刺激は9回ランダムに与え、トライアルは平均40秒の間隔をおいて行なった。驚愕反応のプレパルス抑制の割合を下の式で求めた。この結果を図6 cに示す。なお、結果はTwo-way ANOVAを用いて繰り返し測定してデータを分析し、Two-way ANOVAの繰り返し測定で決定させ、グループ間の違いをStudent's t-testにより求め、平均±s.e.m. (n=10、「*」は $P<0.05$ を意味する)で表した。その結果、DAP12ノックアウトマウスは有意に低い抑制レベルの聴覚性プレパルス抑制を示しており [$F(1, 18) = 5.061, P<0.05$]、この効果は100 dBの驚愕刺激において特に観察された。

(数式1)

1-聴覚性プレパルスにおける驚愕反応及び驚愕成樹トライアル $\times 100$

20 驚愕反応のみのトライアル

聴覚性驚愕反射作用は単純な神経回路として知られており、視床からのインプットを受け取り、広い範囲の皮質、中脳、又は後脳の中核から発生するものである。弱いプレパルスによって驚愕反応を修飾させた驚愕反応のプレパルス抑制は感覚運動ゲーティングの評価系であり、この評価は、生物が視床を経た情報の流れを選別し、その後の行動の閾値を

決めているCNSでの中枢抑制過程の理論上の回路（J. Neurosci. 12, 4501-4509, 1992、Brain Res. 499, 7-17, 1989、Brain Res. Bull. 43, 219-228, 1997）と一致している（図4d）。感覚運動ゲーティングの欠陥は、痴呆、精神分裂病、精神分裂病人格障害、強迫症状群、ハンチントン舞踏病、トゥーレット症候群等のヒト神経精神障害の数例でみられる感覚過敏、認知分断及び注意欠陥を引き起こす。従って、DAP12ノックアウトマウスは、視床に特異的なミエリン形成不全によって、驚愕反応の低下及び感覚運動ゲーティング障害を引き起こすと考えられる。また、DAP12ノックアウトマウスが、年老いたとき、その行動や学習能力がより深刻な異常に発展するという可能性も考えられるが、5ヶ月齢でヒトの精神分裂病に似た精神異常症状を示すことが明らかとなった。

産業上の利用可能性

- 15 本発明のミエリン形成発達障害モデル非ヒト動物は、中枢神経系のミエリン形成に発達障害をきたすモデルや、ミエリン形成過程を研究するモデルや、ミエリン形成異常により生ずる痴呆症等の精神神経障害の発症過程を研究するモデル等に有用であり、またかかる実験モデル動物を用いると、那須ーハコラ病、痴呆、精神分裂病、精神分裂病人格障害、
- 20 強迫症状群、ハンチントン舞踏病、トゥーレット症候群等の精神神経障害に至るメカニズムを解析し、精神神経障害の進行の予防方法や精神神経障害の治療方法を開発することができる。

請 求 の 範 囲

1. D A P 1 2 (DNAX activation protein 12) 遺伝子機能を染色体上で欠損させ、かつオリゴデンドロサイト発達障害を起こさせることを特徴とするオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物。
2. ミエリン形成発達障害を惹起させたことを特徴とする請求項 1 記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物。
3. 精神神経障害を発症させたことを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物。
4. 精神神経障害が、那須－ハコラ病、痴呆、精神分裂病、精神分裂病人格障害、強迫症状群、ハンチントン舞踏病、又はトゥーレット症候群であることを特徴とする請求項 3 記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物。
5. 非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項 1 ～ 4 のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物。
6. 請求項 1 ～ 5 のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物に被検物質を投与すること、又は該動物由来の組織、器官、若しくは細胞を被検物質と接触させることを特徴とするオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法。
7. 請求項 1 ～ 5 のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物由来の組織、器官、又は細胞を被検物質と接触させ、該細胞におけるミエリン塩基性タンパク質の発現を測定・評価することを特徴とするオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法。
8. 請求項 1 ～ 5 のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物由来の組織、器官、又

は細胞におけるミエリン塩基性タンパク質の発現を測定・評価することを特徴とするオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法。

- 5 9. 請求項1～5のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物におけるミエリン形成の発達又は脱髄の程度を測定・評価することを特徴とするオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法。

- 10 10. 請求項1～5のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物の聴覚性刺激及び／又は聴覚性プレパルス抑制を測定・評価することを特徴とするオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法。

- 15 11. DAP12遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物と野生型非ヒト動物の場合とを比較・評価することを特徴とする請求項7～10のいずれか記載のオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法。

12. 非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項7～11のいずれか記載のオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法。

- 20 13. オリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質が、ミエリン形成促進又は抑制物質であることを特徴とする請求項7～12のいずれか記載のオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法。

- 25 14. 請求項7～12のいずれか記載のオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質のスクリーニング方法により得られるオリゴデンドロサイトの発達促進又は発達抑制物質。

15. 請求項13のいずれか記載のオリゴデンドロサイトの発達促進又

は発達抑制物質のスクリーニング方法により得られるミエリン形成促進又は抑制物質。

16. 請求項1～5のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物を、精神神経障害に対する治療薬のスクリーニングに使用することを特徴とする精神神経障害治療薬のスクリーニング方法。

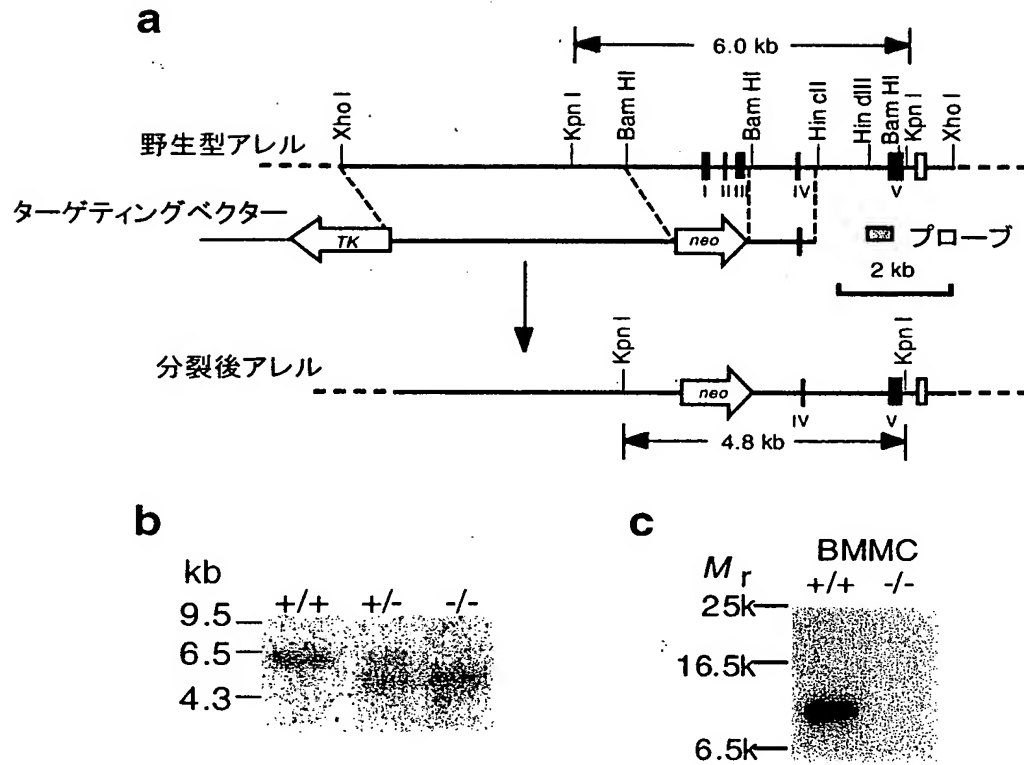
17. 請求項16記載の精神神経障害治療薬のスクリーニング方法により得られる精神神経障害治療薬。

18. 請求項1～5のいずれか記載のオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物の病徴を、精神神経障害の診断に利用することを特徴とする精神神経障害の診断方法。

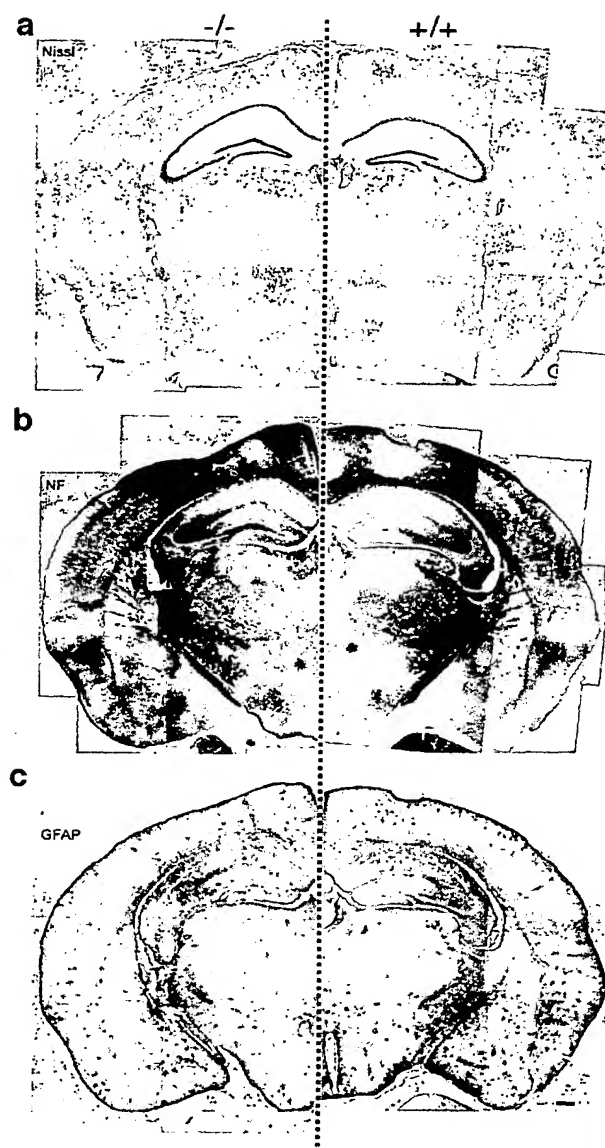
要 約 書

那須－ハコラ病等の精神神経障害に至るメカニズムを解析し、精神神経障害の進行の予防方法や精神神経障害の治療薬、そのスクリーニング方法、治療方法を提供するものである。DAP12遺伝子機能を染色体上で欠損させることによりオリゴデンドロサイト発達障害モデル非ヒト動物を作製した。DAP12ノックアウトマウスは、脳、特に前頭及び視床において、ミエリン低形成、すなわちミエリン形成不全症を含む髄鞘形成障害を起こし、さらに加齢に伴い、那須－ハコラ病等の精神神経障害を示す。これらの障害を起こすDAP12ノックアウトマウスを利用した治療薬のスクリーニング方法及び診断方法、治療方法を開発した。

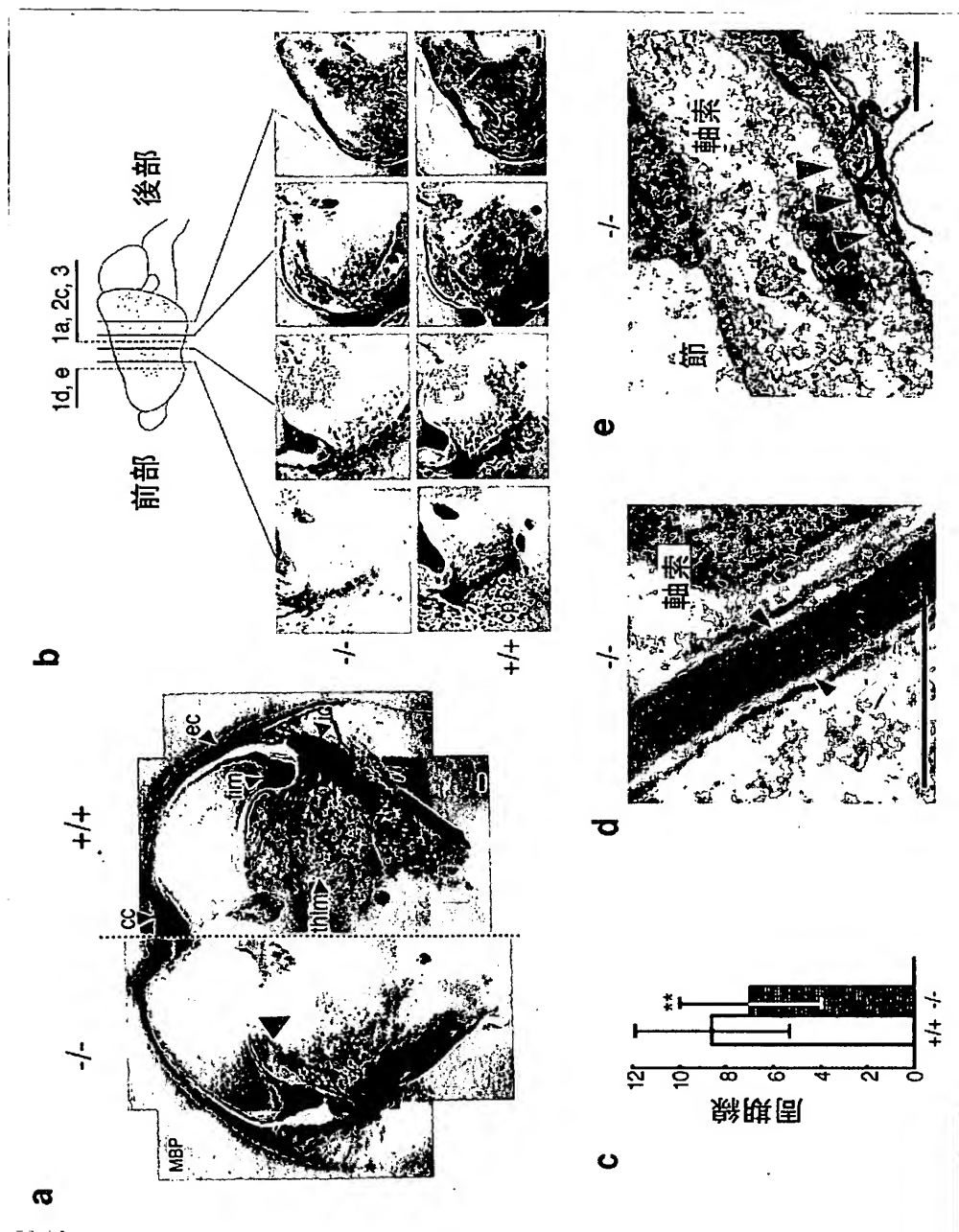
第 1 図



第 2 図

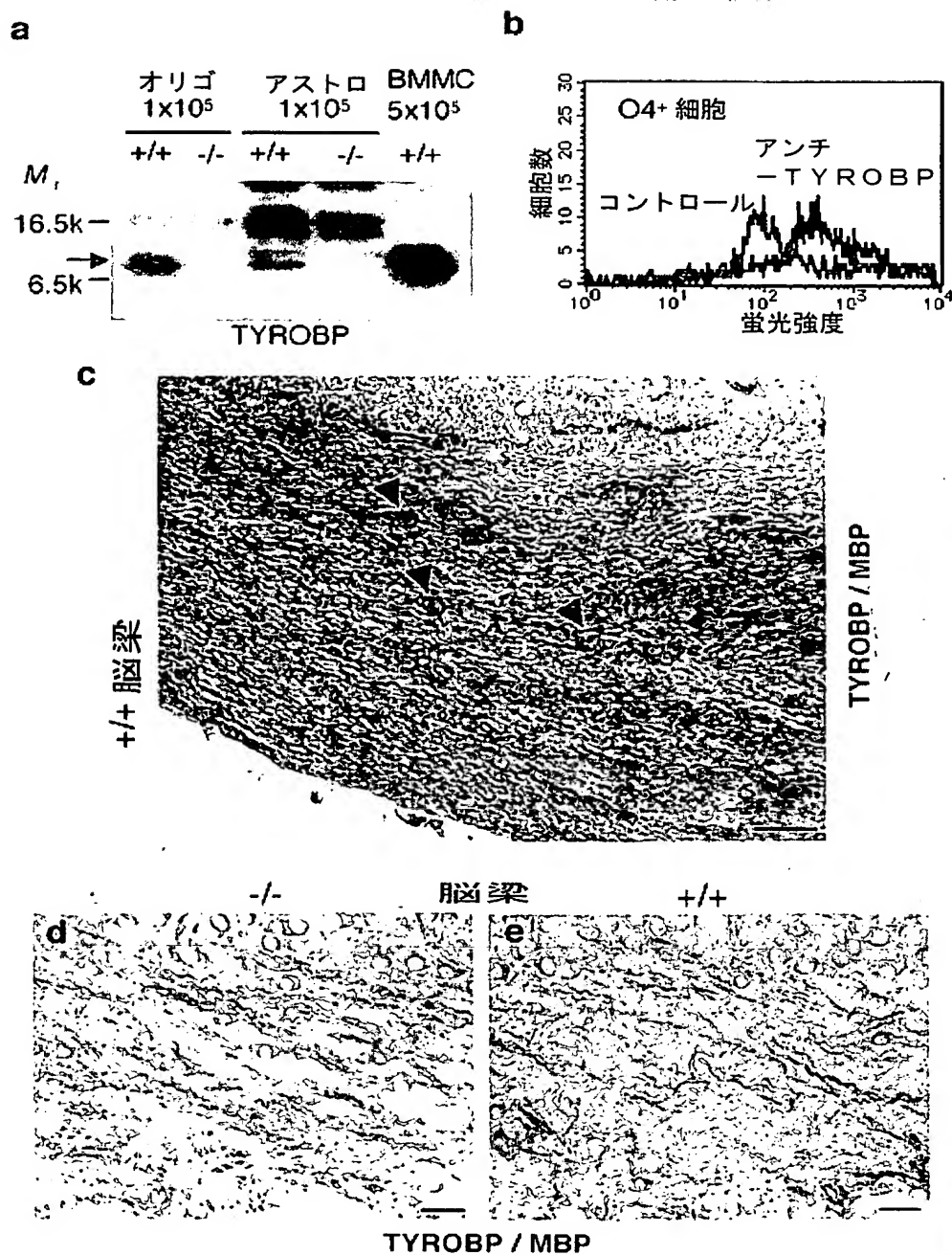


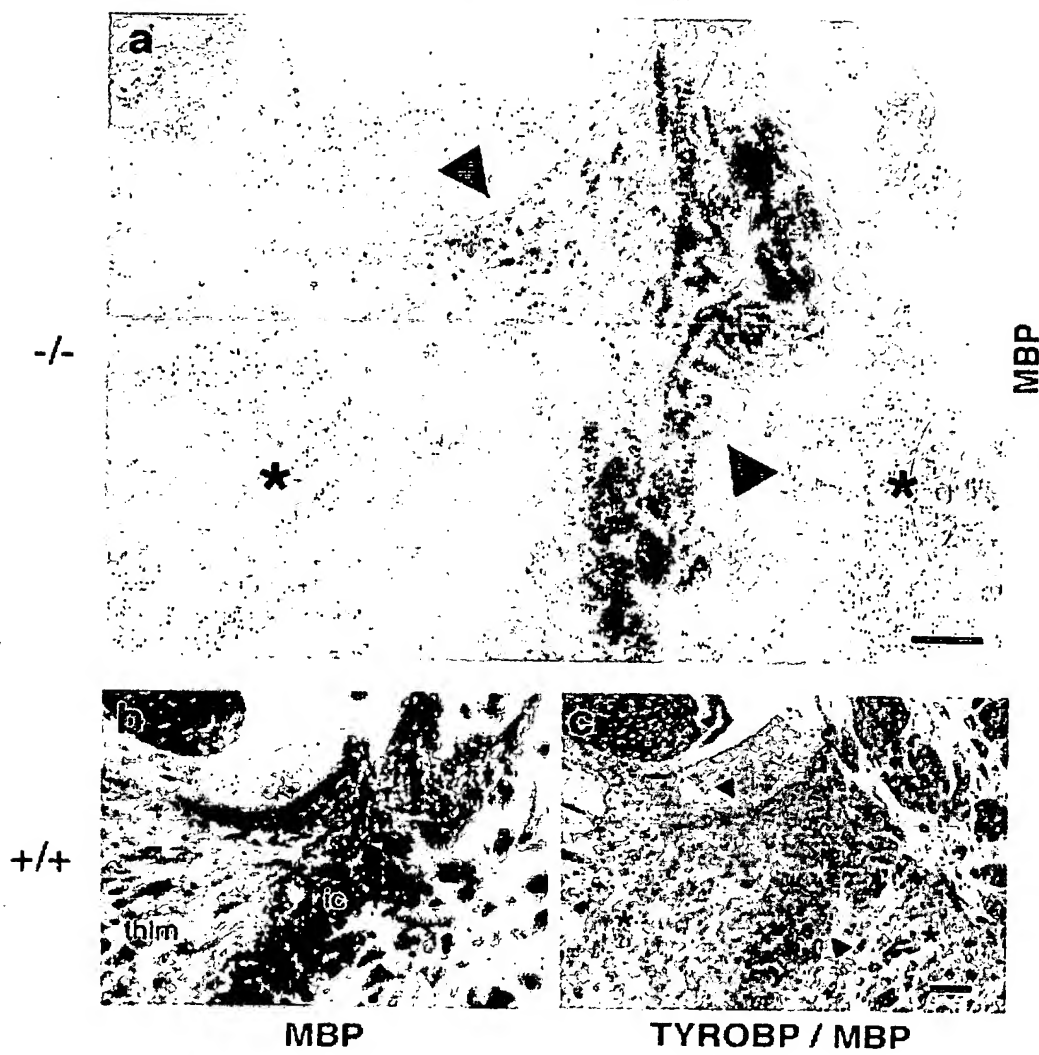
PATENT
OFFICE
JAPAN



PATENT
OFFICE

第 4 図

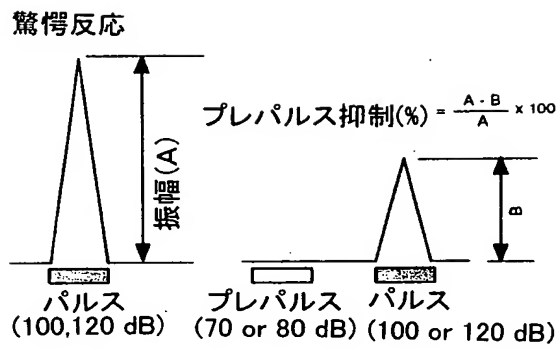




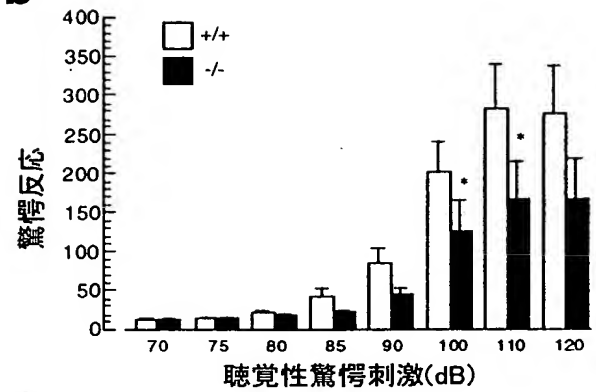
PATENT
OFFICE

第 6 図

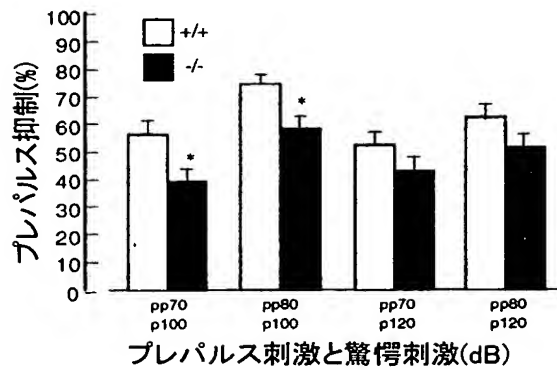
a



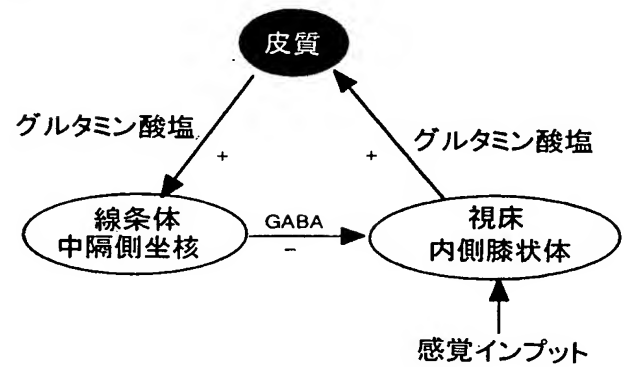
b



c



d



SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Model non-human animals with development disorder of
oligodendroglia

<130> A031-35PCT

<140>

<141>

<150> JP P2001-146338

<151> 2001-05-16

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:P1

<400> 1

atggggggctc tggagccct

19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:P2

<400> 2

tcatcigttaa tattgccct

20

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:P3

<400> 3

atggaccccc caggcta

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:P4

<400> 4

tcagcctctg ccaggca

17

PATENT COOPERATION TREATY

11

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HIROTA, Masanori
3F, Wakabayshi Building, 8-5,
Akasaka 2-chome
Minato-ku, Tokyo 107-0052
Japan

Date of mailing (day/month/year) 24 November 2003 (24.11.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference A031-35PCT	
International application No. PCT/JP02/04405	International filing date (day/month/year) 02 May 2002 (02.05.02)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address Applicant for all designated States except US JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION 1-8, Honcho 4-chome Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address Applicant for all designated States except US JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY 1-8, Honcho 4-chome Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Miki KOBAYASHI (Fax 338-8995)
Facsimile No. (41-22) 338.90.90	Telephone No. (41-22) 338 9401

08.12.03